

“BIOSSENSOR DE ALTA SENSIBILIDADE PARA SALICILATO EMPREGANDO FIBRAS DE CARBONO: AMPLIFICAÇÃO QUÍMICA DE SINAL”.

Refere-se o presente relatório ao desenvolvimento de um biossensor amperométrico com fibras de carbono para determinação de salicilato em amostras clínicas e de medicamentos, bem como o comportamento de diferentes fibras de carbono em sua construção.

O desenvolvimento e aplicação de novos materiais nas últimas décadas têm proporcionado avanços significativos em diversos setores da sociedade moderna.

Entre os diversos materiais estudados atualmente, as fibras de carbono têm merecido uma atenção especial de diversos grupos de pesquisas devido às suas características peculiares, das quais pode ser destacada a baixa densidade associada a uma alta resistência mecânica. Este material foi usado primeiramente nas indústrias aeronáutica e aeroespacial e o sucesso desta aplicação fez crescer as pesquisas e as novas aplicações envolvendo este material, bem como o aprimoramento do processo de fabricação (Donet, J. B.; Enrburger, P.; *Carbon*, **15** (1977) 143; Fourdex, A.; Herindckx, c.; Perret, R. e Ruland W. ; *Compt. Rendus Acad. Sci.* **269C** (1969) 1597).

As áreas de potencial para aplicações das fibras de carbono são quase ilimitadas. Constantes pesquisas são realizadas com respeito a novas aplicações, das quais destacam-se nos últimos anos as aplicações na eletroquímica e áreas correlatas, como a eletroquímica, onde são usadas na construção de sensores e biossensores (Carvalho, R. M.; Kubota, L. T. e Rohwedder, J. J.; *Química Nova*, **22** (1999) 591).

Das principais características que levam à utilização das fibras de carbono na construção de sensores e biossensores é o seu diâmetro (Wightman, R.M., *Anal. Chem.*; **53** (1981) 1125A). O diâmetro das fibras de carbono é de somente poucos “microns” (6-12 μm), que é um fato

muito útil principalmente para a neurociência. As pequenas dimensões das fibras possibilitam a construção de eletrodos em escalas de micrômetros, denominados de ultramicroeletrodos (UME), os quais apresentam características eletroquímicas muito diferentes em relação aos eletrodos clássicos, cujas dimensões se situam na ordem de milímetros. Características como baixa queda ôhmica, corrente capacitiva extremamente pequena, facilidade para alcançar o estado estacionário e uma melhor razão sinal/ruído são encontradas quando se reduz as dimensões dos eletrodos (Silva, S. M.; Alves, C. R.; Correia, A. N.; Martins, R. M.; Nobre, A. L. R.; Machado, S. A. S.; Mazo, L. H. e Avaca, L. A., *Quim. Nova*, **21** (1998) 78. A utilização de uma única fibra na construção do sensor resulta em um ultramicroeletrodo que pode ser colocado próximo de uma única célula em culturas dissociadas ou fatias de cérebro para monitoramento elétrico da atividade de uma simples célula nervosa. Além disto, medidas eletroquímicas *in vivo* ou *in vitro*, na ausência de eletrólito de suporte e voltametrias a velocidades ultra-rápidas podem ser realizadas (Cahill, P. S. e Wightman, R. M., *Anal. Chem.*; **67** (1995) 2599.

Outra característica responsável pelo aumento do interesse de vários pesquisadores na aplicação de fibras de carbono em medidas eletroquímicas, diz respeito à presença de grupos funcionais, contendo principalmente oxigênio na superfície (Csöregi, E.; Gorton, L. e Marko-Varga, G.; *Anal. Chi. Acta*; **273** (1993) 59). A presença de grupos funcionais na superfície das fibras de carbono têm proporcionado a construção de eletrodos quimicamente modificados e de biossensores (Ju, H.X.; Dong, L. e Chen, H. Y.; *Talanta*; **43** (1996) 1177; Zhang, X.; Ogorevc, B.; Tavcar, G. e Svegl, I. G.; *Analyst*; **121** (1996) 1817). Esta e as demais características citadas acima, juntamente com a necessidade de desenvolvimento de novos biossensores, levaram a construção de um biossensor para determinação de salicilato. A necessidade da construção de um biossensor

para salicilato está ligada ao fato da pequena diferença entre a dose terapêutica (1,1 a 2,2 mmol L⁻¹) e a dose tóxica (concentrações acima de 2,2 mmol L⁻¹). Logo, um rápido, efetivo e sensível método para determinação de salicilato em amostras biológicas é desejável, para o diagnóstico de intoxicações por salicilato.

Das muitas metodologias descritas na literatura para determinação de salicilato, destaca-se os métodos: cromatográficos (Bing-Sheng, Y.; Li-Hua, N. e Shou-Zhuo, Y.; *J. High Resol. Chromatogr.*; **20** (1997) 227) , fluorimétricos (Zhu, G. Y. e Yang, J. H.; *Anal. Lett.*; **17** (1984) 1827) e colorimétricos (McDonald, R. P.; "Standard Methods of Clinical Chemistry", vol.5, Academic Press, New York, 1965, p.237). Entretanto, a maioria destes métodos requerem pré-tratamento ou apresentam problemas de interferência. Estes podem ser minimizados com o uso de métodos potenciométricos (Rover Junior, L.; Garcia, C. A. B.; de Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T. e Galembeck, F.; *Anal. Chim. Acta*; **336** (1998) 103) ou amperométricos (Milagres, B., G.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L.T. e Yamanaka, H.; *Anal. Chim. Acta.*; **347** (1997) 35). Porém, os métodos potenciométricos possuem sensibilidade baixa, limite de detecção relativamente alto e tempo de resposta mais longo quando comparado aos métodos amperométricos. Em razão disto, procurou-se desenvolver um método amperométrico simples e seletivo para determinação de salicilato.

Descreve-se aqui: o desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fibra de carbono para determinar salicilato em amostras clínicas e de medicamentos de forma barata rápida e simples, bem como o comportamento de diferentes fibras de carbono na construção do mesmo. O biossensor aqui descrito resulta em um método com baixo limite de detecção e alta sensibilidade. Esta alta sensibilidade, como o leitor pode verificar nos parágrafos seguintes, resulta da amplificação do sinal, que difere este biossensor dos demais citados na literatura. O ponto chave

deste método é a desnecessidade da utilização de um outro sistema acoplado (como a utilização de uma segunda enzima), para que o sinal possa ser amplificado.

O método de determinação envolve o uso da enzima "salicilato hidroxilase" (SH), que converte o salicilato à catecol e dióxido de carbono na presença de NADH e oxigênio. O catecol formado é então oxidado na superfície do eletrodo de fibra de carbono para o-quinona, num potencial fixo de 300 mV em relação ao eletrodo de referência.

Fibras de carbono de cinco diferentes tipos, cujas características podem ser visualizadas na Tabela 1, foram utilizadas neste trabalho.

Tabela 1: Características das fibras utilizadas neste trabalho.

Tipo	Especificações	Módulo de Tensão	Sensor
Grafil	HM S/ 6H GH, 370 GPa	-	Biossensor 1
Toray	T800H, sized	42.7 9 MSI	Biossensor 2
Grafil	XA S 234 GPa	-	Biossensor 3
Sigrifil	HM 4800 B no zizing	-	Biossensor 4
Toray	M40, sized	54.7 MSI	Biossensor 5

Os eletrodos foram construídos com estas fibras, as quais foram inseridas em um tubo de material isolante, deixando exposto apenas uma pequena seção de fibras. O contato elétrico foi feito com fio de cobre e pasta de carbono condutora. Os cinco tipos de eletrodos construídos foram pré-tratados eletroquimicamente em potencial fixo. Após pré-tratamento os mesmos foram modificados por ligação covalente com carbodiimida tendo como base a metodologia utilizada por Csöregi e colaboradores (Csöregi, E.; Gorton, L. e Marko-Varga; G. *Anal. Chi. Acta*; **273** (1993) 59).

Os eletrodos foram imersos em uma solução de carbodiimida, preparada em tampão acetato, durante 60 min. Os eletrodos foram lavados com água destilada e seco em temperatura ambiente por 60 min e então imersos em de solução de enzima (SH), com pH ajustado em tampão fosfato, por 15

mim. Após este passo, os biossensor foram seco em temperatura ambiente por mais 60 mim e estocados em refrigerador.

As fibras de carbono de diferentes procedência geralmente apresentam maior ou menor eletroatividade, dependendo do material precursor e da metodologia utilizada em seu preparo. Por isso, a
5 investigação sobre o mecanismo de resposta do biossensor foi investigado para diferente tipos de fibras. Na Figura 1 os voltamogramas cíclicos utilizando fibras Toray T-800, antes e após a imobilização da enzima, mostram que a imobilização não aumentou a superfície do eletrodo, isto
10 sugere que a camada de enzima imobilizada é bastante fina. Este mesmo comportamento foi observado para os diferentes tipos de fibras de carbono aqui utilizados, vide Tabela 1.

Na Figura 2, encontram-se os voltamogramas cíclicos, ausência, curva (a); na presença de salicilato, curva (b); e na presença de salicilato e
15 NADH, curva (c). (utilizando biossensor confeccionado com fibras de carbono Grafil XA-S). Através desta figura pode-se observar a ausência de corrente de pico sem a presença do cofator NADH, demonstrando a necessidade do cofator NADH para que o sistema possa responder. Este voltamogramas foram obtidos com fibras Grafil XA-S, o comportamento dos
20 outros biossensores é similar.

Um importante ponto que chama a atenção na resposta do biossensor aqui desenvolvido, é a total ausência da corrente de pico catódica, Figura 2. O mecanismo de resposta proposto aos biossensores para salicilato utilizando a enzima "*salicilato hidroxilase*", geralmente é dado pela oxidação
25 eletroquímica do catecol, formado na reação enzimática, na superfície do eletrodo (Moore, T.J.; Joseph, M. J.; Allen, B. W. e Jr. Coury, L. A.; *Anal. Chem.*; **67** (1995) 1896), cuja proposta pode ser melhor visualizada através da Figura 3, onde mostra a representação esquemática do mecanismo de reposta proposto na literatura para maioria dos biossensores para salicilato.

Porém, o comportamento apresentado pelos biossensores de fibra de carbono não pode ser explicado por este mecanismo. Uma explicação para ausência da corrente catódica é um processo catalítico envolvendo catecol e NADH. Esta hipótese foi comprovada através de um experimento onde os voltamogramas cíclicos (VC) foram realizados em uma solução contendo catecol $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com eletrodos sem a presença de enzima. Os resultados são apresentados na Figura 4, onde a curva (a) é o voltamograma cíclico em tampão fosfato pH 7,6; a curva (b) o voltamograma cíclico em solução de tampão contendo catecol; e a curva (c) o voltamograma cíclico em solução contendo catecol e NADH $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Na ausência de NADH os voltamogramas mostram uma pequena corrente, entretanto uma corrente catódica foi possível observar, principalmente para fibras do tipo Grafil HM, como mostrado na Figura 4. Na presença de NADH a corrente anódica aumentou significativamente, desaparecendo a corrente catódica, este comportamento também foi observado para os demais biossensores. Isto é uma evidência de um processo catalítico no sistema, conseqüentemente o mecanismo que explica este comportamento é proposto na Figura 5.

O mecanismo proposto envolve então: a conversão do salicilato para catecol, que é oxidado na superfície do biossensor e perde dois elétrons, transformando em ortoquinona. Esta por sua vez reage com NADH presente na solução e regenera o catecol, que volta a perder dois elétrons e gera nova corrente elétrica. Esta amplificação ocorre sem a necessidade de adição de qualquer reagente.

O fato da amplificação do sinal explica a alta sensibilidade do biossensor, além da necessidade de uma razão salicilato/NADH de aproximadamente 500 para obter o máximo de sinal. Já para os biossensores descritos na literatura esta razão é de aproximadamente 4 (Milagres, B., G.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L.T. e Yamanaka, H.; *Anal.*

Chim. Acta.; **347** (1997) 35). Um comportamento similar, para todos os biossensores de fibra de carbono desenvolvidos, foi verificado indicando que o processo catalítico é responsável por este fato.

Dentre os diversos parâmetros experimentais estudados para estabelecer a que condições o sistema apresenta melhor resposta, um dos parâmetros que apresentou maior discrepância entre os valores encontrados, para cada tipo de fibra utilizada na construção do biossensor, foi o potencial que a catálise é iniciada. Para o biossensor 1 a catálise inicia-se em 37 mV, porém a oxidação do NADH inicia-se em 100 mV, este é um ponto negativo pois a corrente de fundo torna-se alta, conseqüentemente a sensibilidade torna-se menor. Este comportamento pode estar relacionado com estrutura da superfície da fibra ou com os grupos que a mesma contém (Hayes, M.A.; Kristensen, E. W. e Uhr, W. G., *Biosens. Bioelectron.*; **13** (1998) 1297).

A resposta dos biossensores 2 e 4 inicia-se em 150 mV. Para o biossensor 3 a mesma inicia-se em 67 mV, enquanto que para o biossensor 5 em 150 mV. Para estas fibras nenhuma oxidação do NADH foi verificada, em potenciais menores que 100 mV, sugerindo que além o tipo de fibra, o processo de imobilização pode afetar a resposta do biossensor.

O comportamento dos 5 biossensores construídos em três diferentes tampões (TRIS, PIPES e Fosfato) foi investigado. A resposta do biossensor foi avaliada para três diferentes tampões (fosfato, TRIS – HCl e PIPES em pH 7,5). Os experimentos foram feitos em pH 7,5, mudando a concentração de salicilato entre $1,0 \cdot 10^{-7}$ à $8,0 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, deixando a concentração de NADH constante em $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. A maior sensibilidade foi observada com tampão fosfato, seguida por PIPES e TRIS. Alguns estudos demonstraram que íons monovalentes como cloreto podem causar inibição na enzima *salicilato hidroxilase* (White- Stevens, R. H.; e Kamin, H.; *J. Bio. Chem.*, **247** (1972) 2358), isto explica a baixa resposta para TRIS-HCl. É

também descrito que fosfatos podem complexar com o anel piridina do NADH provocando um aumento na velocidade de oxidação (Jr. Rover, L.; Fernandes, J. C. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; Katekawa, E. e Serrano, S. H. P.; *Anal. Biochem.*, **260** (1998) 50), isto pode explicar a maior sensibilidade na resposta do biossensor quando o tampão fosfato é usado. Para todos os biossensores o comportamento foi similar, sendo as melhores sensibilidades encontradas para o fosfato. Em relação a concentração do tampão, os experimentos foram feitos nas concentrações entre 0,05 a 0,25 mol L⁻¹ de tampão fosfato, e a melhor resposta foi obtido na concentração de 0,2 mol L⁻¹.

O limite de resposta linear para todos os biossensores é muito amplo como pode ser verificado na Tabela 2, especialmente para o biossensor 2 que mostra das faixas de resposta linear. Esta característica é bastante importante para aplicação do biossensor em diferentes tipos de amostras.

Tabela 2: Características dos biossensores construídos

	DPR (%)	Sensibilidade (mA mol ⁻¹ L)	Tempo de Resposta (s)	Potencial de oxidação inicial (mV)	Faixa linear (μ mol L ⁻¹)	Limite de detecção (nmol L ⁻¹)
Biossensor 1	8,6	9,8	2,7	37	1,0 – 9,0	330
Biossensor 2	4,1	20,8 56,0	3,5	150	0,10 – 1,93/ 1,96 – 12,0	56
Biossensor 3	6,4	2,9	4,0	62	1,0 – 15,0	210
Biossensor 4	15	18,0	4,8	146	0,75 – 1,8	280
Biossensor 5	11	4,5	3,2	100	0,40 – 1,4	310

A estabilidade foi diferente para cada biossensor, mostrando que as características das fibras de carbono são muito importantes para fornecer um bom processo de imobilização, ou dar eletroatividade por um longo tempo. O biossensor 5 foi o menos estável tornando impossível realizar mais que 20 medidas. Para o biossensor 1, 3 e 4 a estabilidade foi similar, permitindo aproximadamente 85 determinações, mais menos estável que o biossensor 2, o qual permite mais de 100 determinações.

Os limites de detecção, considerando 3 vezes o sinal do ruído foram,

330, 56, 210, 280 e 310 nmol L⁻¹ para os biossensores 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Os limites de detecção são similares para todos os biossensores, exceto para o biossensor 2 que mostrou um baixíssimo valor.

Com relação a sensibilidade o biossensor 2 também, apresentou um grande diferença em comparação aos outros, dando uma sensibilidade de 55,6 mA L mol⁻¹. Este valor é 3 vezes maior o valor encontrado para o biossensor 4 (18,5 mA L mol⁻¹), 6 vezes o biossensor 1 (9,8 mA L mol⁻¹), 12 vezes ao biossensor 5 (4,5 mA L mol⁻¹) e 20 vezes ao biossensor 3 (2,9 mA L mol⁻¹).

O tempo de resposta para todos os biossensores foi bem menor comparado aos outros biossensores descritos na literatura (Milagres, B., G.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L.T. e Yamanaka, H.; *Anal. Chim. Acta.*; **347** (1997) 35). O tempo de resposta foi aproximadamente 5 segundo para todos os biossensores como pode ser visto Tabela 2. Este comportamento indica que as enzimas estão bem expostas na superfície das fibras de carbono proporcionado um boa resposta.

A correlação entre os resultados obtidos para cada tipo de fibras usada na preparação do biossensor não é clara para escolher o melhor biossensor. Dos resultados obtidos na Tabela 2, a escolha o melhor biossensor foi feita considerando os parâmetros na forma normalizada. Os parâmetros considerados para o fator de seleção foram; o desvio padrão relativo, sensibilidade e potencial que o biossensor inicia a resposta. Se este parâmetros forem considerados em seus valores absolutos o resultado final não pode ser interpretado. Então, para normalização fez-se necessário atribuir o mesmo peso para cada parâmetros. A divisão dos parâmetros pelo respectivo maior valor foi feita para normalização. A equação utilizada para expressar o fator de seleção (FS) dos parâmetro normalizados foi a seguinte:

$$FS=SN/(DPRN \times PAN)$$

Eq. 1

onde: SN é a sensibilidade normalizada, DPRN é o desvio padrão relativo normalizado e PAN o potencial aplicado normalizado necessário para iniciar a resposta do biossensor. Baseado nesta equação verifica-se claramente que altos valores de FS indicam o biossensor que possui a melhor performance. Baseado neste contexto o biossensor preparado com fibras de carbono Toray T800 foi o melhor.

Os valores encontrados para o salicilato em amostras de medicamentos e urina foram concordantes com os valores encontrados através do método de Trinder (British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationary Office, London, 733 (1980)), como pode ser visto na Tabela 3. Considerando o nível de confiança de 95% os resultados podem ser considerados o mesmo. Estes resultados mostram a boa performance do biossensor nas determinações de salicilato.

Tabela 3: Resultados obtidos para o biossensor e método de referência.

Fármaco	Quantidade encontrada mg/tablete (ácido acetil salicílico)	
	<i>Biossensor</i>	<i>Método de referência</i>
I	85 ± 3	81 ± 1
II	81 ± 2	83 ± 5
III	80 ± 2	75 ± 1
Urina	Quantidade encontrada mg/ml (salicilato)	
	<i>Biossensor</i>	<i>Método de referência</i>
AMI	416 ± 12	419 ± 5
AMII	355 ± 11	366 ± 5

Os biossensores preparados com fibras de carbono de alto módulo mostraram bons resultados exceto o biossensor 5, porém a fibra utilizada na construção deste é de alto módulo, ou seja apresenta um elevado grau de alinhamento carbono-carbono, ligados paralelamente na direção axial da fibra. A processo de transferência de elétrons nas fibras ocorre preferencialmente com orientação lateral (Csöregi, E.; Gorton, L. e Marko-Varga; G. *Anal. Chi. Acta*; **273** (1993) 59), o qual explica porque as fibras de alto módulo apresenta de maneira geral melhor performance. Este fato

demonstra que o processo de imobilização também é importante para obter um biossensor com boa performance.

O processo de amplificação no eletrodo de fibra de carbono foi um importante ponto verificado para os biossensores pois aumenta a sensibilidade sem a adição de reagentes. Este é um processo elegante de amplificação destes biossensores para salicilato.

Ressalta-se ainda que comportamento das diferentes fibras na processo de amplificação do sinal foi o mesmo, isto sugere que diferentes fibras de carbono podem ser usadas na construção de biossensores para salicilato.

Outro ponto de muita importância é possibilidade da utilização da reação catalítica para determinação de NADH, isto é, utilizando eletrodos de fibras de carbono em presença de catecol que é oxidado na superfície do eletrodo, a ortoquinona formada é reduzida pelo NADH, como mostrado Figura 4, curva (a) voltamograma cíclico do eletrodo de fibra de carbono em solução tampão, curva (b) em presença de catecol, curva (c) voltamograma cíclico em presença de catecol e NADH.

Também é importante ressaltar que o biossensor aqui desenvolvido apresenta altíssima sensibilidade, baixo limite de detecção e curto tempo de resposta e amplo limite de resposta linear.

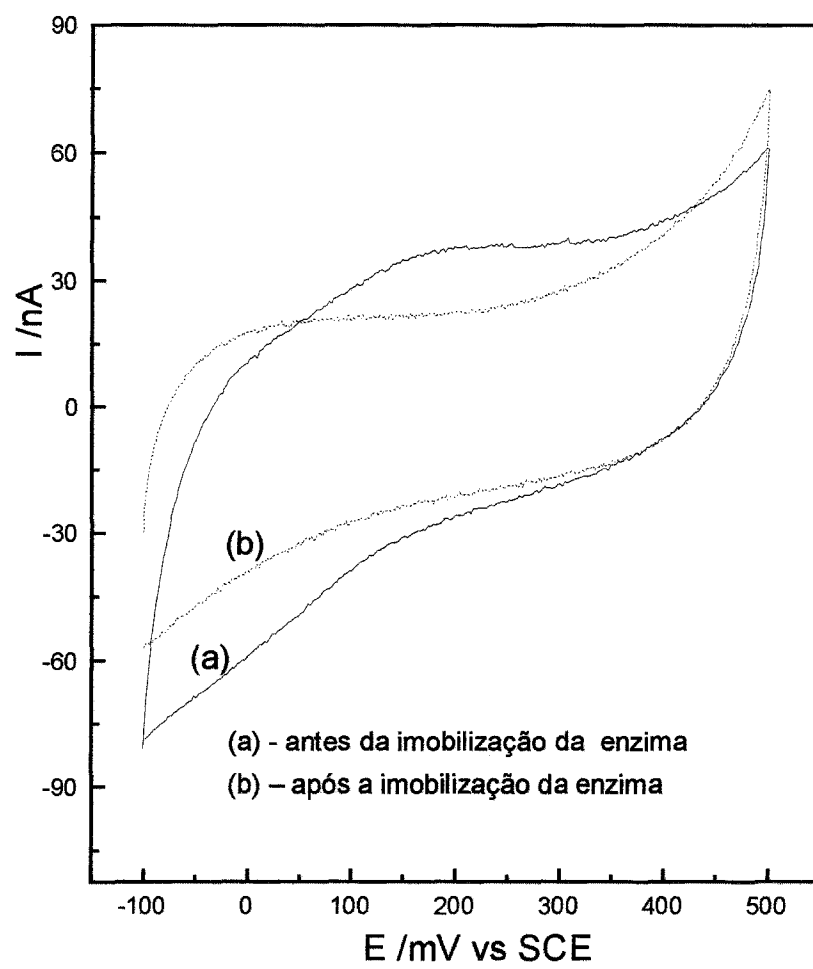


Figura 1

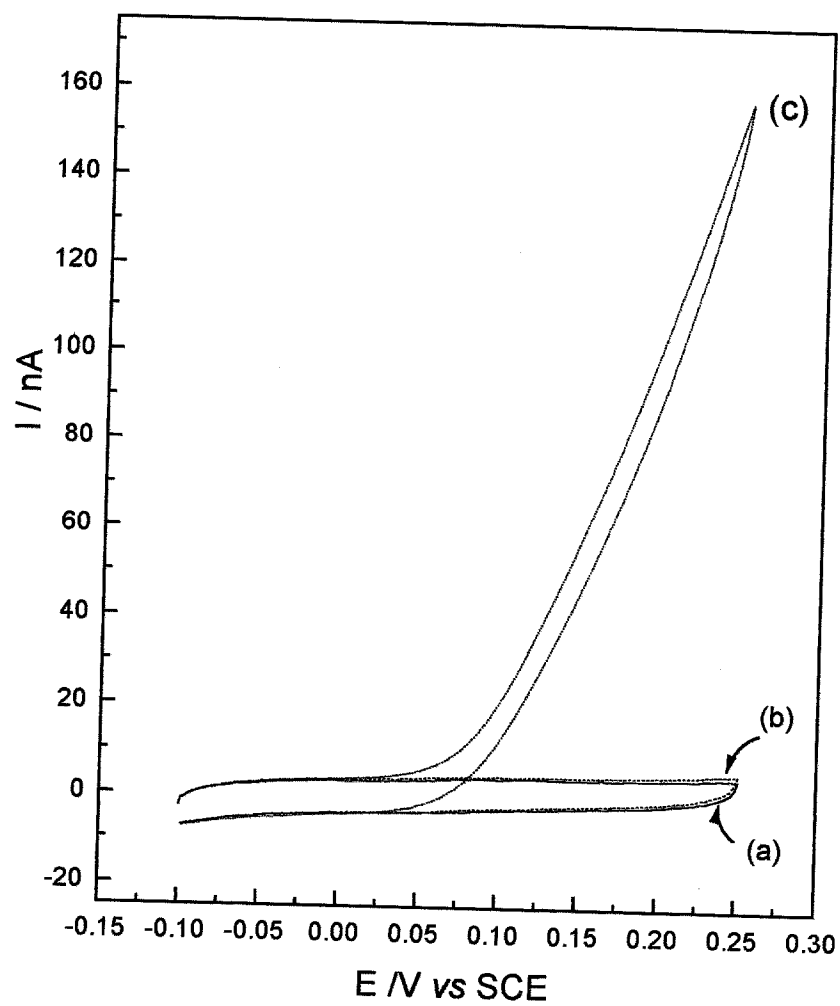


Figura 2

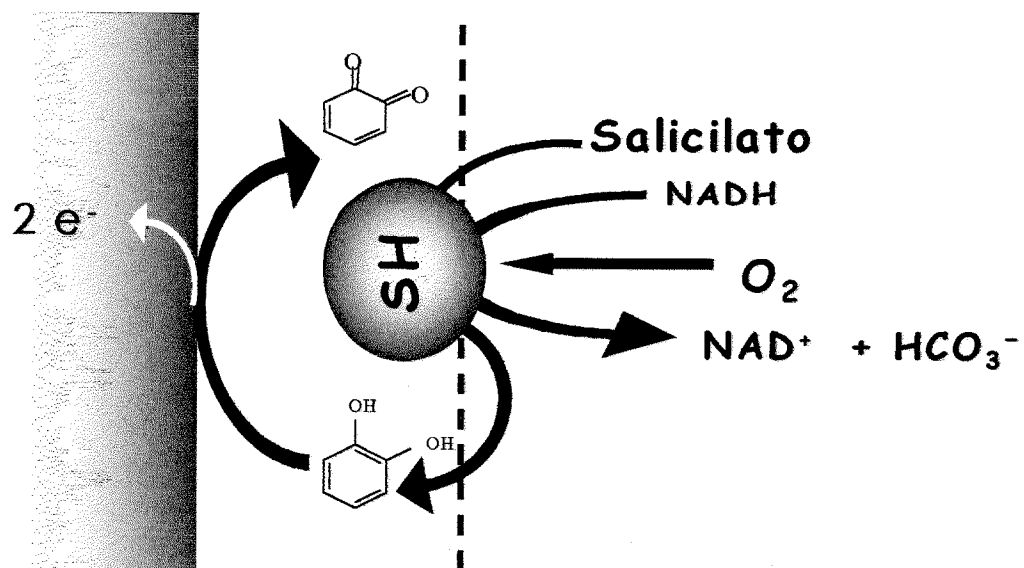


Figura 3

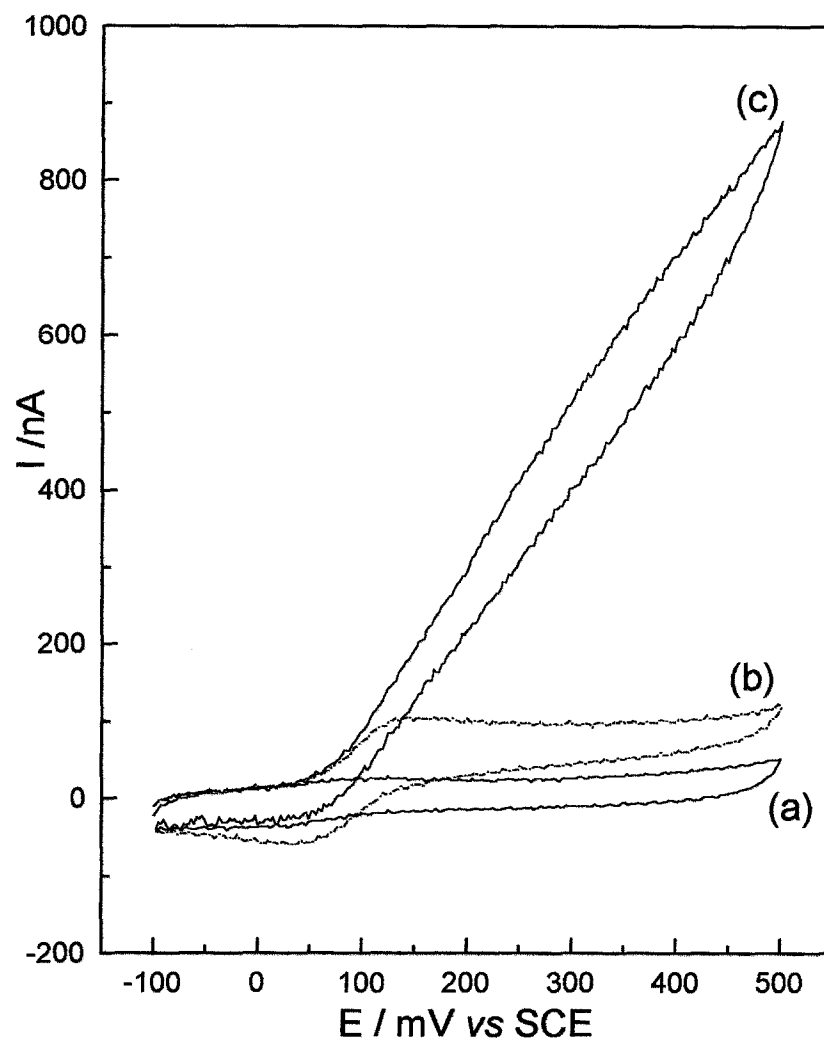


Figura 4

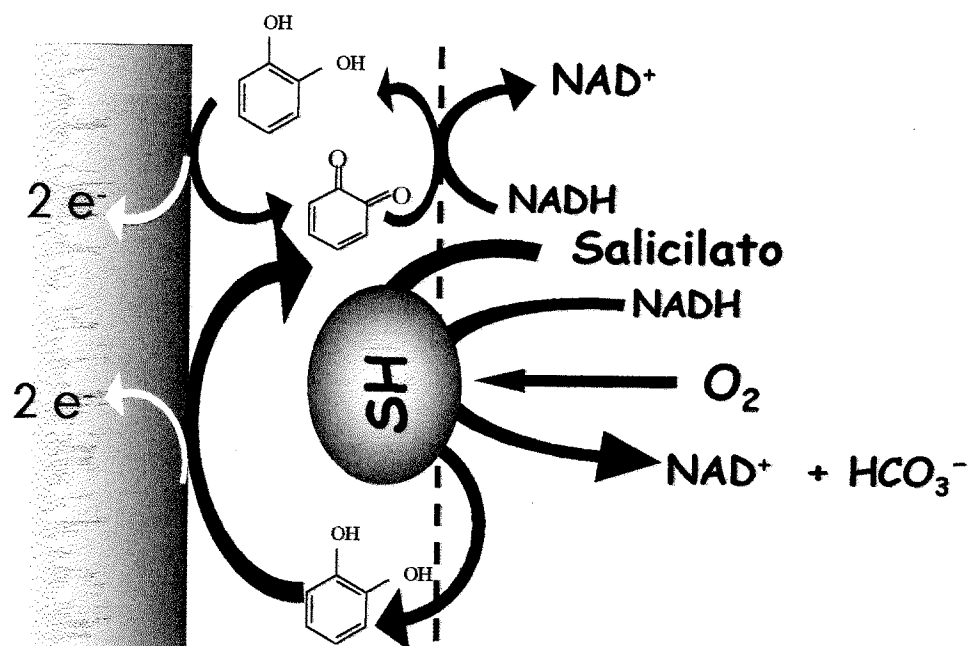


Figura 5

REIVINDICAÇÕES

1. “BIOSSENSOR DE ALTA SENSIBILIDADE PARA SALICILATO EMPREGANDO FIBRAS DE CARBONO: AMPLIFICAÇÃO QUÍMICA DE SINAL”, caracterizado pelo

5 desenvolvimento de um biossensor a base de fibras de carbono, preparação, otimização e aplicação em amostras reais.

RESUMO

“BIOSSENSOR DE ALTA SENSIBILIDADE PARA SALICILATO EMPREGANDO FIBRAS DE CARBONO: AMPLIFICAÇÃO QUÍMICA DE SINAL”.

5 A presente invenção refere-se ao desenvolvimento e otimização e aplicação em amostras reais de um biossensor amperométrico de alta sensibilidade para salicilato. Capacidade de amplificar o sinal sem a necessidade de adicionar reagentes ou acoplar sistemas secundários. Descreve-se também a utilização de diferentes tipos de fibras na construção do biossensor,

10 bem como a seleção do melhor biossensor.